

## University of Groningen

### Snap Shots of Bacterial Adaptation

Prajapati, Bimal

DOI:  
[10.33612/diss.145910301](https://doi.org/10.33612/diss.145910301)

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2020

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
Prajapati, B. (2020). *Snap Shots of Bacterial Adaptation*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.145910301>

#### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

#### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# Appendix

Nederlandse Samenvatting

Acknowledgements

Biography



## Nederlandse Samenvatting

Het vermogen tot snelle en adequate aanpassing aan veranderende omstandigheden is van eminent belang voor alle levende organismen en bacteriën vormen beslist geen uitzondering op deze regel. Het onderzoek dat beschreven staat in het onderhavige proefschrift was gericht op de bestudering van het aanpassingsvermogen van twee Gram-positieve bacteriën, *Bacillus subtilis* en *Staphylococcus aureus*. Verschillende ‘transcriptomics’- en ‘proteomics’-benaderingen werden in het onderzoek toegepast en hiermee was het mogelijk om een aantal aanpassingsprocessen in de bacteriën tot op moleculair niveau te ontleden. Dit verschaftte nieuwe inzichten in de onderliggende mechanismen die de bacteriën gebruiken om zich aan te passen aan verschillende stresscondities, teneinde de schadelijke effecten van deze condities te beperken. **Hoofdstuk 1** van dit proefschrift omvat een algemene inleiding betreffende het bacteriële aanpassingsvermogen en de verschillende technieken, waarmee dergelijke processen bestudeerd kunnen worden.

De experimentele **Hoofdstukken 2 en 3** zijn gewijd aan de bestudering van aanpassingsprocessen in de bodembacterie *Bacillus subtilis* als reactie op veranderingen in de NaCl-concentraties in het leefmilieu. In de beschreven experimenten werd het zoutgehalte van het kweekmedium van *B. subtilis* drastisch veranderd door de bacteriën over te brengen van het zogenaamde LB-medium met 1% NaCl naar LB-medium zonder NaCl. Een dergelijke verandering in het leefmilieu is geen bijzonderheid voor *B. subtilis*, want als reguliere bewoner van de bodem zal deze bacterie frequent te maken krijgen met een dergelijke stress-conditie, zoals het geval is bij zware regenval of overstromingen.

**Hoofdstuk 2** beschrijft het belang van de Tat-route voor eiwittransport bij de aanpassing van *B. subtilis* aan een plotselinge verlaging van het zoutgehalte in het bacteriële leefmilieu. Eerdere studies hadden al laten zien dat de afwezigheid van kernelementen van de Tat-route van *B. subtilis*, ook bekend als TatAyCy, resulteert in bacteriële cel-lysis wanneer de bacteriën geïntroduceerd worden in LB-medium zonder NaCl. Dit lysis-fenotype bleek samen te hangen met de afwezigheid van de peroxidase EfeB, een eiwit dat met behulp van de TatAyCy-eiwitten over de cytoplasmamembraan van *B. subtilis* getransporteerd wordt. Na opname in de membraan vormt EfeB een onderdeel van het zogenaamde EfeUOB ijzer-opnamesysteem. EfeB draagt bij aan de ijzeropname

door  $\text{Fe}^{2+}$  om te zetten in  $\text{Fe}^{3+}$  dat via de ijzer-permease EfeU door de cel opgenomen kan worden. Voor de katalyse van deze omzetting maakt EfeB gebruik van het voor de cel schadelijke waterstofperoxide. Slechts een zeer beperkt deel van de TatAyCy-deficiënte bacteriepopulatie slaagt er in de stress, die veroorzaakt wordt door de afwezigheid van NaCl, te overleven. Bij aanvang van dit promotieonderzoek was het nog niet bekend, waarom de Tat-deficiënte *B. subtilis* cellen onder deze condities lyseren en hoe sommige bacteriën uit de populatie er in slagen om te overleven in een milieu met weinig zout. De transcriptoomanalyse van Tat-deficiënte *B. subtilis* bacteriën vlak voor het moment waarop massale cel-lysis optreedt en in de daaropvolgende herstelfase, waarin de bacteriën weer groeien, verschaftte de benodigde inzichten om te kunnen begrijpen waarom de bacteriën lyseren in LB-medium zonder NaCl en hoe ze zich aan deze verandering in hun leefmilieu aanpassen. De analyse van het transcriptoom liet met name duidelijk zien, dat de Tat-deficiënte *B. subtilis* bacteriën zware oxidatieve stress ondervinden die de opname van voedingsstoffen uit het kweekmedium bemoeilijkt. In feite is in de lysis-fase de expressie van veel genen die betrokken zijn bij de opname van nutriënten sterk verlaagd, hetgeen op zich een afdoende verklaring is voor de waarneming dat de Tat-deficiënte bacteriën stoppen met groeien en lyseren. De transcriptoom-analyse van de zich herstellende bacteriepopulatie liet zien dat de bacteriën niet langer oxidatieve stress ondervinden ten gevolge van cellulaire aanpassingen. Tevens bleek dat de Tat-deficiënte bacteriecellen proberen om het verhongeren te voorkomen door het aminozuur arginine als belangrijkste koolstofbron te gebruiken.

De waarnemingen beschreven in **Hoofdstuk 3** hebben betrekking op de rol van het kleine regulatoire RNA-molecuul 'S313' bij de aanpassing van *B. subtilis* aan een leefomgeving met weinig NaCl. De afwezigheid van S313 in mutante bacteriën resulteert in een groei-fenotype in LB-medium zonder NaCl, dat in sterke mate overeenkomt met het groei-fenotype van Tat-deficiënte bacteriën in dit medium. Het fenotype van de *B. subtilis* bacteriën die S313 missen is echter minder extreem dan het fenotype van Tat-deficiënte bacteriën (**Hoofdstuk 3**). Deze vergelijkbare groeifenotypes van de *s313* of *tat* mutante bacteriën zijn in overeenstemming met de voorspelling op basis van bioinformatica dat S313 een mogelijke rol speelt in de regulatie van ijzer-opname door *B. subtilis*. Hierbij werd namelijk voorspeld dat S313 bindt aan een mRNA-segment dat stroomopwaarts van het *eFeO* startcodon en in het *eFeU*

messenger-gedeelte gelegen is. Zoals reeds hierboven vermeld is EfeU de permease die zorgt voor opname van  $\text{Fe}^{3+}$  als onderdeel van het EfeUOB-systeem (**Hoofdstuk 2**). Northern blotting-experimenten lieten vervolgens zien dat de veronderstelde interactie tussen S313 en het mRNA van het *efeUOB*-operon inderdaad correct is en dat S313 waarschijnlijk het *efeU* mRNA stabiliseert. De transcriptoomanalyses van de *s313* mutante bacteriën in LB zonder NaCl, vlak voor het moment dat hun groei stopt en op een later tijdstip, waarop de bacteriën hun groei hebben hervat, laten opmerkelijke overeenkomsten zien met het transcriptoom van Tat-deficiënte bacteriën vlak voor de lysis-fase en gedurende de herstelfase. De *s313* mutante bacteriën hebben eveneens hinder van oxidatieve stress aan het membraanoppervlak ten gevolge van gedereguleerd ijzer-transport via EfeUOB en ze vertonen ook verschijnselen van uithongering en een afhankelijkheid van arginine voor het herstel en verdere aanpassing. Ondanks de grote overeenkomsten met betrekking tot de aanpassingen die Tat-deficiënte bacteriën laten zien in LB-medium zonder zout zijn er ook opmerkelijke verschillen in het gedrag van de *s313*- en *tat*-mutanten. Zo zijn er verschillen met betrekking tot de expressie van genen die gereguleerd zijn door de sigmafactor SigW en die in resistentie tegen bepaalde antibiotica resulteren, waaronder cefuroxim. Ondanks deze verschillen bleken echter zowel de *s313*- als de *tat*-mutanten gevoeliger te zijn voor cefuroxim dan wild-type *B. subtilis*, hetgeen suggereert dat de resistentie tegen cefuroxim waarschijnlijk te maken heeft met gedereguleerd ijzer-transport via EfeUOB. Dit vermoeden werd bevestigd door overexpressie van het *efeU*-gen, het voorspelde doelwit van S313, waardoor niet alleen de normale groei van de bacteriën in LB-medium zonder NaCl hersteld werd, maar ook de resistentie tegen cefuroxim. Alle resultaten tezamen beschouwd illustreert dit onderzoek heel mooi hoe een klein regulatorisch RNA-molekuul een grote invloed kan uitoefenen op de gen-regulatie en een belangrijke rol speelt bij het vermogen van een bacterie om zich aan te passen aan veranderende omstandigheden. Het onderzoek liet verder zien hoe belangrijk het ijzer-transportsysteem EfeUOB is voor aanpassingen aan een leefomgeving met weinig NaCl of aan de aanwezigheid van antibiotica zoals cefuroxim.

Uitgaand van het belang van de Tat-translocase voor eiwittransport in *B. subtilis* en het voorkomen van oxidatieve stress aan het membraanoppervlak, werd het onderzoek beschreven in **Hoofdstuk 4** gestart om de effecten van Tat-overexpressie te onderzoeken. In dit geval werd gebruik gemaakt van een

zogenaamde  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$ -metabole labeling, waarmee de genoom-wijde effecten van overexpressie van de TatAyCy translocase op de fysiologie van *B. subtilis* onderzocht kon worden. Een interessante optie in de context van dit onderzoek was de mogelijkheid dat de effecten van TatAyCy-overexpressie op processen in het cytoplasma, de membraan en het extracellulaire milieu afzonderderlijk geanalyseerd konden worden. Dit liet allereerst zien dat TatAyCy-overexpressie in een sterke inductie van het LiaRS stress-respons-systeem resulteerde, een resultaat dat verder gestaafd werd door de LiaRS-afhankelijke overexpressie van het LiaH-eiwit. Een zeer verrassende waarneming was dat Tat-overexpressie resulteerde in een prolongatie van de vegetatieve staat van de bacteriën, ondanks de zeer hoge niveaus van TatAy en TatCy. Dit suggereert dat mogelijk schadelijke effecten van TatAyCy-overexpressie gecompenseerd kunnen worden door inductie van het LiaRS-systeem. Daarnaast bleek TatAyCy-overexpressie ook een negatieve invloed te hebben op de expressie van eiwitten die betrokken zijn bij competentie en biofilm-vorming. Al deze waarnemingen waren in overeenstemming met de eveneens waargenomen verhoogde expressie van de gen-regulator AbrB, die van groot belang is voor de overgang van exponentiële groei naar de stationaire groeifase. Met betrekking tot de resultaten beschreven in **Hoofdstukken 2 en 3** is het vermeldingswaardig dat TatAyCy-overexpressie veranderingen in de eiwitten voor arginine-synthese en -afbraak tot gevolg had. Toevoeging van arginine aan het kweekmedium leidde tot een groeistimulans voor de TatAyCy-overproducerende bacteriën. Tezamen suggereren deze waarnemingen dat het aminozuur arginine een nog belangrijker rol speelt bij eiwittransport via 'twin-arginine translocatie' dan oorspronkelijk werd vermoed op basis van de identificatie van de twee gepaarde arginine-residuën in de desbetreffende signaalpeptides.

**Hoofdstuk 5** beschrijft experimenten die tot doel hadden om aanpassingsprocessen in de twee nauw-verwante meticilline resistente *S. aureus* (MRSA) isolaten D03 en D17 van de USA300-lijn te karakteriseren, die zich voordoen wanneer de bacteriën blootgesteld worden aan sub-inhibitoire hoeveelheden van het antibioticum ciprofloxacin. Dit onderzoek is gebaseerd op de oorspronkelijke waarneming dat de minimale inhiberende concentratie (MIC) van ciprofloxacin aanzienlijk hoger wordt als deze twee MRSA isolaten korte tijd blootgesteld worden aan een subinhibitoire concentratie van 0,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ciprofloxacin. Na een incubatietijd van slechts 4 uur vertoonde het D17-isolaat een 8-voudige verhoging van de MIC voor ciprofloxacin, terwijl de MIC

van het D03-isolaat met ongeveer een factor twee toenam. De MIC-waardes daalden weer naar het originele niveau als de beide isolaten verder gekweekt werden in afwezigheid van ciprofloxacin. Hieruit kon geconcludeerd worden dat de verhoogde MIC van ciprofloxacin het gevolg was van tijdelijke aanpassingen van de bacterie. Om deze aanpassingen te bestuderen werd het RNA van de bacteriën die aan ciprofloxacin waren blootgesteld vergeleken met het RNA van niet-blootgestelde bacteriën door middel van sequentie-analyse. De resultaten lieten zien dat de D03- en D17-isolaten op een zeer vergelijkbare wijze reageerden op de aanwezigheid van ciprofloxacin. Beiden vertoonden een inductie van genen die nodig zijn voor het herstel van DNA-schade, waaronder de zogenaamde SOS-respons. Dit was te verwachten aangezien het bekend is dat ciprofloxacin interfereert met enzymen die nodig zijn om het bacteriële DNA in een goede conditie te houden. Daarnaast bleek, om tot dusver onbekende redenen, de expressie van een aantal andere genen voor metabole enzymen van *S. aureus* in beide isolaten na blootstelling aan ciprofloxacin verhoogd te zijn. Er waren echter twee belangrijke verschillen in de reacties van beide isolaten. Allereerst bleek het D03-isolaat veel sterker op ciprofloxacin te reageren met betrekking tot het aanschakelen van genen voor DNA-herstel dan het D17-isolaat. Bovendien vertoonde het D03-isolaat een sterke inductie van genen van bacteriofagen, terwijl dit in het D17-isolaat niet werd waargenomen. De inductie van bacteriofagen in het D03-isolaat is in principe voldoende om het lagere aanpassingsvermogen van het D03-isolaat aan subinhibitoire ciprofloxacin concentraties te verklaren, aangezien de inductie van bacteriofagen voor bacteriën een zware metabole belasting betekent die vaak tot cel-lysis leidt. Tenslotte werd waargenomen dat de blootstelling aan ciprofloxacin de expressie van een aantal genen met onbekende functies induceerde. Het is van belang om de functies van deze genen in een toekomstig onderzoek nader te bestuderen, omdat ze wellicht betrokken zijn bij de bacteriële resistentie tegen het in klinisch opzicht belangrijke antibioticum ciprofloxacin.

### **Conclusies en perspectieven voor toekomstig onderzoek**

Het beschreven onderzoek aan de Tat-translocase van *B. subtilis* heeft laten zien dat dit transportsysteem voor eiwitten over de bacteriële cytoplasmamembraan een belangrijke rol speelt bij het voorkomen van oxidatieve stress aan de buitenkant van deze membraan. Oxidatieve stress wordt veroorzaakt door reactieve zuurstofmoleculen (in het Engels 'reactive oxygen species' of ROS),



waaronder  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  and  $NO$ . Dergelijke moleculen vormen een serieuze bedreiging voor micro-organismen, doordat ze essentiële cellulaire componenten zwaar kunnen beschadigen (McBee et al, 2017). Alle micro-organismen die in contact komen met zuurstof beschikken derhalve over mechanismen die bescherming bieden tegen ROS en die oxidatieve schade kunnen herstellen. Dit is dermate belangrijk dat de meeste micro-organismen, waaronder *B. subtilis*, zelfs over meerdere beschermingssystemen tegen ROS beschikken. *B. subtilis* heeft bijvoorbeeld twee katalases, KatA and KatE, die  $H_2O_2$  in het cytoplasma detoxificeren. Daarnaast maakt *B. subtilis* voor hetzelfde doel gebruik van de peroxidase EfeB, maar dan aan de buitenkant van de cytoplasmamembraan. Uit het onderhavige onderzoek blijkt nu dat deze functionele overlap niet onder alle condities voldoende is, bijvoorbeeld wanneer *B. subtilis* gekweekt wordt in de afwezigheid van NaCl. In dergelijke omstandigheden blijkt EfeB een sleutelrol te spelen in de bescherming tegen oxidatieve stress. Aangezien de Tat-translocase verantwoordelijk is voor de correcte localisatie van EfeB is dit eiwittransportsysteem eveneens een cruciaal onderdeel van de cellulaire mechanismen die nodig zijn voor een adequate bescherming tegen oxidatieve stress. In afwezigheid van EfeB, of een functioneel Tat-systeem, blijkt een fractie van de *B. subtilis* populatie desondanks de zware oxidatieve stress te kunnen overleven. Dit kan mogelijk ook toegeschreven worden aan een functionele redundantie die in dit geval systemen voor eiwittranslocatie betreft. In de overlevende cellen blijkt EfeB namelijk op een Tat-onafhankelijke manier, mogelijk via de Sec-route, gesecreteerd te worden. De vraag is echter wel of EfeB in dit geval enzymatisch actief is en kan bijdragen aan het voorkomen van oxidatieve schade aan cellulaire componenten. Mogelijk is het ook zo dat de katalases KatA and KatE aan het begin van de lysis-fase in bepaalde cellen dermate hoog tot expressie kwamen, dat deze cellen de oxidatieve stress konden overleven. Tezamen zijn deze stress-reacties waarschijnlijk voldoende om de schade tengevolge van verhoogde  $H_2O_2$ -concentraties op het membraanoppervlak te overleven.

De beschreven waarnemingen aan het EfeUOB-systeem voor ijzer-opname onderstrepen het grote belang van ijzer voor de bacterie *B. subtilis* en de zorgvuldige omgang met dit element om oxidatieve stress te voorkomen. Dit laatste doel wordt bereikt door de omzetting van  $Fe^{2+}$  in  $Fe^{3+}$  ten koste van  $H_2O_2$ . Dit beperkt het ontstaan van ROS door  $Fe^{2+}$ -gemedieerde Fenton-reacties. Een verrassende waarneming was dat niet alleen de peroxidase EfeB hiervoor nodig

is, maar ook de transmembraan-permease EfeU. Mogelijk draagt EfeU hieraan bij door de  $\text{Fe}^{3+}$ -concentratie aan het membraanoppervlak laag te houden, waardoor het evenwicht van de omzetting van  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  die door EfeB gecatalyseerd wordt in de richting van  $\text{Fe}^{3+}$  verschuift. De ontdekking dat het kleine regulatorische RNA molecuul S313 betrokken is bij de expressie van *efeU* laat bovendien zien, dat dit ijzer-transportstelsel sterk gereguleerd is en verbonden is met veel andere systemen die een cruciale rol spelen in de bacteriële cel. Dit idee wordt met name versterkt door de waarneming dat, in afwezigheid van S313 of EfeU, de *B. subtilis* cellen veel gevoeliger zijn voor antibiotica zoals cefuroxim. Dit suggereert dat er een tot dusver nog niet opgehelderd regulatorisch netwerk betrokken is bij zowel de opname van ijzer als ook de resistentie tegen antibiotica.

Een andere sleutelwaarneming in het onderhavige promotie-onderzoek betreft de centrale rol van het aminozuur arginine in eiwit-translocatie via de Tat-route. De waargenomen aanpassingen in het arginine-metabolisme, elke keer wanneer de activiteit of aanwezigheid van het Tat-translocase of het EfeUOB-systeem voor ijzer-transport beïnvloed worden, suggereren dat arginine niet alleen als bouwsteen voor eiwitten fungeert, maar daarnaast nog andere functies vervult. Dit aminozuur lijkt in ieder geval ook als voedingsstof te dienen en wellicht beïnvloedt het ook de eiwitvouwing en translocatie. Van L-arginine is bekend dat het eiwitten kan stabiliseren en eiwit-aggregatie voorkomt. Bovendien kan het de oplosbaarheid van gevouwen en ongevouwen eiwitten verbeteren (Kim et al, 2016; Tischer et al, 2010). Het is bovendien in eerder onderzoek gesuggereerd dat eiwitten die veel arginine-residuën op hun oppervlak exponeren stabiel zijn dan eiwitten met weinig arginine-residuën aan het oppervlak (Strub et al, 2004). Tenslotte zijn sommige arginine-bevattende peptides goed in staat om biologische membranen te passeren (Nakase et al, 2017; Futaki, 2017). In het hier beschreven promotie-onderzoek bleek L-arginine in staat te zijn om de lysis van *tat*-mutanten of *s313*-mutanten van *B. subtilis* in LB-medium zonder NaCl te onderdrukken. Daarnaast hielp L-arginine om de groei te verbeteren van *B. subtilis* cellen waarin het Tat-systeem tot overexpressie was gebracht. Het vermogen van L-arginine om het lysis-fenotype van de *tat*- en *s313*-mutanten te onderdrukken moet waarschijnlijk toegeschreven worden aan het gebruik van dit aminozuur als koolstofbron om verhongering ten gevolge van de zware oxidatieve stress aan het membraanoppervlak te

verkomen, aangezien hierdoor de opname van andere voedingsstoffen bemoeilijkt lijkt te worden.

Toekomstig onderzoek zou zich moeten richten op de rol van arginine in de eiwit-translocatie via de Tat-route met speciale aandacht voor de mogelijk verschillende effecten op eiwit-vouwing en eiwit-translocatie. In dit opzicht zal het niet alleen interessant zijn om te bepalen of verschillende extracellulaire arginine-niveaus van invloed zijn op de Tat-afhankelijke eiwit-translocatie, maar ook of er wellicht een invloed is op de eiwit-translocatie via de Sec-route. Het zal tevens van belang zijn om *in vitro* de vouwing van Tat-substraten, zoals EfeB en QcrA, te onderzoeken in de aanwezigheid van verschillende arginine-concentraties om te bepalen in welke mate arginine dit proces beïnvloedt. Indien dergelijke analyses de veronderstelde rol van arginine in het Tat- of Sec-afhankelijke eiwit-transport bevestigen, is het wellicht een interessante optie om via aanpassingen van de metabole routes voor de biosynthese of afbraak van arginine het cellulaire arginine-gehalte te moduleren. Dergelijke mechanistische verbanden tussen aminozuur-metabolisme, eiwit-vouwing en eiwit-translocatie zullen een geheel nieuwe dimensie toevoegen aan fundamentele en toepassingsgerichte studies naar het bacteriële eiwit-transport.

Het beschreven onderzoek laat ook zien hoe een enkel klein regulatorisch RNA-molecuul, het S313, van grote invloed kan zijn op de bacteriële homeostase. Een dergelijke waarneming roept de vraag op welke functies de andere 154 kleine RNA segmenten van *B. subtilis* hebben (Nicolas et al, 2012). Tot dusver is de rol van slechts een kleine subset van deze RNA-moleculen in detail beschreven, maar het lijkt zeer aannemelijk dat een substantieel aantal van deze moleculen een rol speelt in de cellulaire homeostase en adequate reacties op chemische en fysieke prikkels. Een uitgebreide analyse naar de functies van al deze RNA-moleculen zal cruciaal zijn om hun bijdrage aan de complexe gen-regulatorische processen in de bacteriële cel in kaart te brengen en te begrijpen. De studies beschreven in **Hoofdsuk 3** laten zien dat het *efeU*-gen één van de targets van S313 is, maar de analyse van de S313-deficiënte bacterie-cellen laat tevens zien dat S313 een rol speelt bij de resistentie tegen cefuroxim. De beschikbare data suggereren een mogelijke rol van SigW, EfeU en het EfeUOB-transportsysteem in de resistentie tegen dit antibioticum, maar verder onderzoek is noodzakelijk om het onderliggende mechanisme volledig op te helderen.

Tenslotte laten ook de studies, waarbij *S. aureus* USA300-isolaten blootgesteld werden aan subinhibitoire hoeveelheden ciprofloxacin zien dat fysiologische en genetische aanpassingen die leiden tot antibioticum-resistentie hand in hand gaan en elkaar niet uitsluiten. Dit idee wordt ondersteund door de waargenomen inductie van genen voor herstel van beschadigd DNA. De eiwitten die door deze genen gecodeerd worden kunnen bij het DNA herstel mutaties introduceren die op hun beurt aanleiding geven tot ciprofloxacin-resistentie. Ciprofloxacin blijkt bovendien bacteriofagen te induceren, hetgeen er toe kan leiden dat resistentie-genen van bacteriën met de meeste mutaties gedeeld kunnen worden met andere bacteriën via bacteriofaag-gemedieerde gen-overdracht. Het is enigszins ironisch om te zien dat de bacteriofaag-inductie enerzijds bijdraagt aan het bacterie-dodende effect van het antibioticum ciprofloxacin en anderzijds de verspreiding van de resistentie tegen dit antibioticum bevordert. Als er geen bacteriofaag-inductie plaats vindt krijgen de bacteriën daarentegen de mogelijkheid om door fysiologische aanpassingen tijdelijk resistent te worden tegen ciprofloxacin. In dit scenario vervullen bacteriofagen de rol van een tweesnijdend zwaard, hetgeen de aandacht vestigt op mogelijke nadelen van de tegenwoordig veelbesproken toepassing van bacteriofagen in de strijd tegen antibioticum-resistente micro-organismen. Voor toekomstige studies zal het tevens van belang zijn om de invloed van subinhibitoire hoeveelheden ciprofloxacin op het bacteriële metabolisme te onderzoeken, op grond van de waargenomen inductie van genen voor de transketolase Tkt en de aminopeptidase YhfE. In deze context zou het ook de moeite waard zijn om de biologische functies te onderzoeken van tot dusver niet-gekaracteriseerde genen die ook door de aanwezigheid van ciprofloxacin geïnduceerd worden. De door deze genen gecodeerde eiwitten zouden wellicht een belangrijke rol kunnen spelen in processen, zoals DNA-ontwinding, DNA-herstel, het cellulaire metabolisme en de resistentie tegen ciprofloxacin. Dergelijk onderzoek is van belang, omdat ciprofloxacin nog steeds een krachtig en klinisch relevant antibioticum is. Het is derhalve een waardevol geneesmiddel in een tijd waarin de bacteriële resistentie tegen antibiotica in hoog tempo toeneemt.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat het onderzoek beschreven in dit proefschrift een aantal belangrijke momentopnames laat zien van bacteriële aanpassingsmechanismen die een rol spelen bij het overleven van veranderende omstandigheden in hun leefmilieu. De waargenomen verwevenheid van

reacties op eenvoudige prikkels zoals een verlaagde zoutconcentratie en de resistentie tegen antibiotica onderstreept het belang van verder fundamenteel onderzoek naar bacteriële aanpassingsmechanismes. Dergelijk onderzoek naar de onderliggende gen-regulatorische processen zal uiteindelijk niet alleen van belang zijn voor de toepassing van bacteriën zoals *B. subtilis* als fabriekjes voor waardevolle eiwitten en chemicaliën, maar ook voor een effectieve bestrijding van belangrijke ziekteverwekkers zoals MRSA.

## Acknowledgements

They say time flies and so it has. I came to Groningen seven years ago for my Masters's and here I am in 2020 soon defending this thesis to receive my PhD. After seven years of living in Groningen, it has become a home away from home for me. Over the years, I met many people here and made wonderful memories that I will cherish throughout my life. It has been a wonderful journey and in the final part of this thesis, I would like to extend my gratitude to everyone who helped in this process.

First and foremost I'd like to thank my promoters: Prof. Jan Maarten van Dijl and Prof. Alex Friedrich. Jan Maarten you have been an amazing teacher. You have not only helped me grow as a scientist but your wisdom and easy-going attitude has inspired me to be a better human being. I admire your hardworking nature and lead by example philosophy. I will not only remember the scientific discussions but also remember the many social interactions we had in Christmas parties, Sinterklaas celebrations, lab outings, my wedding and cozy dinners at each other's home. I hope we will have a long lasting professional and personal relationship even after this PhD is over. Dear Alex thank you for being my promoter as well. Your busy schedule made our meetings scarce but you were definitely there when I needed you. I would like to thank you for the opportunity you provided me to go to Nepal and try to establish a collaborative research project. Though the research collaboration didn't come to fruition I did take the opportunity to give talks about research in Netherlands and specially research in the UMCG and RUG.

I would also like to thank Rita. Thank you for being so understanding even though we hijack most of Jan Maarten's time. Thank you for your kindness and being such an amazing host every time we were there at your place.

I would like to thank Professors from the reading committee: Prof. Kok, Prof. Buscher and Prof. Harwood. Thank you for carefully reading my thesis and approving it. Thank you Hermie and Girbe for all the guidance and insightful comments during the lab meetings. Thank you for being amazing hosts at Sinterklaas parties from the lab. Thank you Anne for your help with all the bioinformatic analyses. Without your help Chapter 5 of this thesis would not be complete.

I am very lucky to have the most wonderful life partner. Thank you and lots of love to my wife Pragy Shrestha. Not only have you taken care of me during the tireless nights of doing experiments and the writing process. I am forever indebted with your love and patience. I can't even count all the times you travelled to the lab in the cold and rain, in the middle of the night to bring me a warm dinner when I was working overnight at the lab to complete the experiments. I don't know who else would do that except you. Getting married amidst the PhD has just made our bond stronger and I know we will be the happiest as we grow old together. Lots of love and thank you for being in my life I couldn't have done this without you.

I'd like to thank both my dad and mom for always being supportive and motivating me to achieve the best in whatever I do. Likewise, I'd like to thank my mother in law and father in law for all their love and caring nature. I'm grateful to them for constantly keeping in touch and motivating us to be the best versions of our selves. Thank you to my sister Tripti for inspiring me to apply for scholarships to study abroad. Without your experience and insight, I would probably not have got the opportunity to come to the Netherlands to do my Masters which opened the doors to do this PhD. I'm also thankful to my brother in law for taking care of my sister and my nephew Shivansh. Thank you, my brothers in law Pragyan and Nivid. You guys have been amazing moral support for both me and Pragy.

I'd like to thank my paranymphs Tim, Marines and Marina. You guys are awesome and I know you will make the defense day special despite this ongoing pandemic. Tim you are a great friend and a wonderful colleague. As I tell you and everyone else you are my "bfam" brother from another mother. I will forever cherish the amazing times we had in the lab, in the clubs, in the bar, bouldering, climbing, travelling, cooking etc. I wish you and your family Ezra and Naomi good health and happiness. Marines you are an amazing friend to me and Pragy. You have always helped us in times of need and we are glad to be part of your support in this country away from our beloved families. I always enjoy your funny and in times naughty conversations. You are always such a sport to be around. Marina you came midway of my PhD to the lab. But we were officemates from the start and I think we hit off at the right note. You are always entertaining to be around. Travelling with you during the conferences has been the most fun, both to Paris and to Copenhagen. I must thank you for the

immense help you put in doing the microscopy experiments for the resubmission of my paper. Your energy always amazes me.

Thank you Mathijs for being a great friend. You are the best dutchie I know and my closest friend outside my study and work circle. We met at Squadraat but you have not only been an amazing squash buddy but a friend who is always around to help in times of need. Thank you for all the help and for the amazing time we have spent together.

Thank you to the Nepali gang (Suruchi, Samiksha, Greeshma) in Groningen. Because of you guys Groningen feels like a home away from home. Suruchi d you are the first Nepali I met here in Groningen back in 2013. You guided me as a senior during the Master's study and helped me throughout my PhD as well. The casual and scientific conversations we had along with coffee at the Gezonde Planeet will always be a part of my PhD experience. Samiksha d you are one of the strongest and most independent women I know. It is remarkable to see how you have progressed in your professional life. The fun chats you, I and Pragyi have during our dinners and overnight stays will be with me forever. And I will never forget our travel adventures to France. Greeshma, though you were here for a short amount of time, I remember the Dashain celebrations that we had at your place here in Groningen. Plus, you have been a great support to Pragyi. I'd like to thank you for that.

Thank you to my office mates. Over the years in MOLBAC I stayed in the same office for 6 years. But I had several officemates in those 6 years. First it was Jolien, Solomon and Francisco. Jolien I missed you in our office after you left for Greifswald. It was always fun to have a chat with you after a hectic day in the lab. I'd like to thank you for hosting me when I was visiting Greifswald. Really you made my stay easier and so much better. Solomon it was a pleasure to have you as our office mate too. I miss all the fun stuff you me and Tim did together. I'd like to thank you too for making my stay in Greifswald pleasurable. I'll remember the long pool matches we had. Francisco you were the go-to guy whenever we had any issues with IT. Thank you for all the times you solved our problems. Everyone still remembers you as the cookie monster.

When the three of you left, 3 more came to our office. This time it was Marina, Yaremit and Usma. I have had an amazing time with all of you. We started the "Monday Fries" tradition. It wasn't the most consistent tradition but we still



managed to have fun with it. I'll always remember our office dinner dates that were so much fun and delicious of course.

Rocio and Pieter, I'm glad I met you two. Both me and Pragyí admire the creativity you two have and it has inspired us to take on our own creative ventures. Thank you for being creative and making our props for our wedding. We are forever grateful to you both. Margarita and Eric, you two are probably the sweetest couple we know. The brunches we had at each others place will be in my memories always. Maggie I'd also like to thank you for your support in the lab and the useful scientific discussions we had for our projects. Best of luck on your new endeavour as a scientist in a startup company. I know you will succeed in whatever you do. Andrea you have been an amazing friend. We became close friends after I took you around Leiden on a bike. You are an amazing person, great cook and always fun to be around. I'll never forget the countless evening we have spent together. Weird you are a true gentleman. It was nice to know you and thank you for all the fun times we had at your place.

Thank you to all my friends and colleagues from MOLBAC. It's been a wonderful place to work for the past 6 years of my life. I have made lots of friends and wonderful memories that I will cherish forever. Xin, you have been an amazing friend. The table tennis matches with you were always so much fun. I wish you all the best and success for your future. Marco, you were in our lab for a short time but you have a big place in our hearts. I will remember you as a people's person who can create a good vibe where ever you go. Giorgio your tiramisu will never be forgotten. Thank you for introducing us to the amazing world of Italian deserts. Stefano, the whisky night at you places was one of the craziest. Francis, you are a quite one but a great guy. I enjoy the talks on business, economics, politics and life with you. Not to mention you guys were also part of the incredible MOLBAC poker club.

Min I will remember the badminton game I played with you. Elisa it's always fun to chat with you and welcome to the mountain biking club. I hope our dream of skiing together comes true soon. Ayşegül you are one on the newest member of MOLBAC but I am glad I got to know you. Thank you for continuing part of my research. I hope it will open new frontiers that we can explore together. Laura you came from Greifswald to Groningen but it didn't take long for us to get along too. Though you were with us for just around 2 years we had an amazing time. I'll remember the dancing at the Medical Microbiology Christmas party and the

time you, Patric, Pragi and I spent in Giethoorn. That boat ride along the canals and through lake is etched in my memory.

Jolanda and Ruben I'd like to thank you both for being my supervisors when I first started as a Masters student at MOLBAC. Thank you for all the things you taught me and all the help you have provided me. Sjouke thank you for being a great sport in the lab and helping me with the RNA isolations and every other problem you solved for me.

Mafalda, Tiago and Rita my Portuguese buddies. I'm grateful to have met the three of you. Mafalda I hope you remember your first outing in Groningen with me and Tim. Thank you for all the enthusiastic research collaborations though we couldn't use those for this thesis. Tiago you are a mood maker, super funny and always fun to be around. Yanyan, Lu, Elias, Paola it was a pleasure knowing all of you. Thank you for all the interactions we had. We might not have spent a lot of time together but I will miss you guys too. Tobi you are an amazing guy. I'm confident you will be a great lab captain and make our lab a better place. The mojito you made was awesome and I hope we have fun nights like that in the days to come. Ana though you are here for such a short period of time it was great knowing you. I hope we stay in touch. Gaby and Oliver, it was nice to know both of you as well. I'll remember the time we had dinner at our place along with Roman. He is really, really cute and growing fast. Marjolien and Tobias I am happy to have met both of you and I hope we stay in touch. Lianne I can't stop raving about your creativity. Dennis and Rense, it was great knowing both of you. You really kept our lab running and were always there to solve any troubles we had. Rense I still can't get around how you can take an ice bath when its freezing outside. And Dennis I hope your escapades in making stained glasses is still going strong. Lianne, Eleni, Corinna, Arezoo, Niels, Eric, Jasper, Femke, Ewoud, Jorrit, Ikram and Mehdi it was nice to know you all and thanks for the good times at MOLBAC.

My students have played an important part in this journey to complete my PhD. Larissa, Sebastian and Hong Yu, all of you have contributed to make my PhD successful and I am grateful for your support.

I would also like to thank Desire. You have always been caring and supportive of me since the beginning of my Masters. I hope you are doing well. I would also like to thank Prof. Schmidt for hosting me in her lab for a two-month internship when I first arrived in Groningen. I would like to specially thank Gerard and

Meta, doners of the Eric Bleumink Fund (EBF) and Derk the program manger of EBF. I got the opportunity to come to Netherlands because of the EBF scholarship. Likewise, I'd like to thank the other members of the EBF gang: Yonas, Bakari, Chima and Jean Claude. I will remember the fun times we had together. Lucie I am glad that I had the opportunity to meet you and your family. The Christmas in Clermont Ferrand is still the best Christmas I had.

I'd like to thank all the collaborators in Greifswald. Thank you Prof. Völker and Prof. Becher for your support and guidance. Special thanks to Ulrike, your deep understanding of the transcriptomic approaches has made this thesis possible. Thank you Jürgen, Marc, Hermann, Leif, Minia, Sandra, Andreas and Stephan for helping with the experiments and data analysis.

Randy I will remember the cocktail evenings, potluck dinner and binge-watching Netflix at your place. Arthur thank you for freezing the important memories of my life so I can visit them again and again. Santoshi and Jimmy, it's been a pleasure knowing you two. Both Pragy and I enjoyed the board games and dinner dates with you two. Viviana, Abel, Jeremy and Natalie it has been a pleasure knowing you. Thank you for all the fun times. Joana thank you for being a good friend of Pragy and introducing us to Brazilian food and culture.

Last but not the least, one of the most important change in my life after coming to Groningen was me being introduced to squash. I fell in love with the sport and joined the student squash association, Squadraat in 2015. I made many friends at Squadraat and my time at the club helped me improve as a squash player. Now, I am a diehard squash fanatic and will be associated with the sport for life. I'd like to thank coach Sebastian for training me and helping me improve. I'd also like to thank all my Squash buddies Jeroen (van Asselt and Baars), Milan, Adam, Arun, Sabine, Kiro, Bronger, Thomas, Bauke, Roel, Cees, Dennis, Michiel, Hester, Hessel, and Brenda. Truly it's been a pleasure being a member of Squadraat.

Please forgive me if I missed mentioning your name. Thank you once again to everyone for sharing part of your life with me.

Bimal

Groningen, 29<sup>th</sup> October 2020



Bimal Prajapati was born on the 24<sup>th</sup> of September 1988 in Kathmandu, Nepal. He studied Bachelor of Pharmacy at Kathmandu University, Nepal. In the final year of his Bachelor, he worked on a research project investigating self-emulsifying drug delivery systems for indomethacin for which he and his team received the best project award. He graduated top of his class with distinction in 2012. He then received the prestigious Eric Bleumink Fund

scholarship and joined the topmaster program, Medical and Pharmaceutical Drug Innovation at the University of Groningen, the Netherlands. During the first year he interned at the Department of Pharmaceutical Biology under the supervision of Prof. Gerrit Poelarends. During this first internship he was involved in engineering the enzyme 4-Oxalocrotonate tautomerase in order to increase its substrate scope. In the second year of his Masters' he joined the molecular bacteriology (MOLBAC) lab of Prof. Jan Maarten van Dijk at the University Medical Center Groningen. Here he was involved in elucidating the function of a small regulatory RNA S313 in *B. subtilis*. After graduating with cum laude in 2015 he received a PhD fellowship and continued his research in Prof. van Dijk's lab. During his PhD he investigated the adaptive behavior of *B. subtilis* in conditions with low salinity and the development of adaptive resistance in *S. aureus* on exposure to subinhibitory concentration of ciprofloxacin. The research work done during his PhD is described in this thesis. Apart from doing research Bimal is an avid squash player, foodie and traveler.